

臨床領域で対策が求められている薬剤耐性菌の 河川環境中における動態

学校法人 大阪医科薬科大学
大阪薬科大学大学院薬学研究科 東 剛志

1. はじめに

1.1 研究の背景

近代的で豊かな現代社会の高度化が進む一方で、薬剤耐性菌の出現と蔓延の問題が世界的な規模で進行しつつある。ヒトの活動と環境との関わりは複雑な相互関係を有しており（図 1）¹⁾、薬剤耐性菌の問題は医療領域におけるヒト－ヒト間における蔓延のみにとどまらず、野生動物や畜産動物、又は水や土壌環境を経由して、最終的にヒトに感染する環境リスクについても考慮する必要があることが、国内外の研究者により報告されている^{2, 3)}。



図 1 薬剤耐性菌とヒト・環境との関わり¹⁾

WHO は各国に国家行動計画の策定を求めており⁴⁾、日本においても薬剤耐性の蔓延抑止に向けたアクションプランが制定され対策が進んでいる⁵⁾。これらの計画の中で、薬剤耐性菌が環境中でも分布又は流入している可能性が懸念されるため、環境リスクについて研究を行うことの重要性が挙げられている。しかしながら、環境を対象として薬剤耐性菌について検討を試みた研究事例は世界的にみても知見が限られており、未だ不明なことも多いのが現状である。そのため、水環境中における薬剤耐性菌の実態を把握し、環境リスクの評価に向けた取り組みを模索していくことは、水質向上と流域保全において重要な課題であると同時に、社会的にも重要な課題となっている。

1.2 河川環境中における薬剤耐性菌の存在実態調査を行うことの重要性

薬剤耐性菌の問題は暮らしの幅広い領域に関連する課題となっており、ヒトの健康を守るためには、ヒトも動物も環境も同じように健康であることが重要であるため、ヒト－動物－環境による包括的な対策として、ワンヘルス（One Health）による取り組み（図 2）が提唱されている^{4, 6)}。

抗菌薬はヒトだけではなく、畜産業、水産業、農業など幅広い分野で用いられている。動物への抗菌薬の投与の伴い薬剤耐性菌が発生し、動物から人間へ薬剤耐性菌が伝播することが報告されており⁷⁾、ヨーロッパ諸国を中心に家畜に対する抗菌薬使用の制限が進められている⁸⁾。また、薬剤耐性菌や抗菌薬による環境汚染の検出事例についても報告がなされており、水系汚染や農産物の汚染につながる可能性が懸念されている^{9, 10)}。日本では、都市河川においてヒトに由来する薬剤耐性大腸菌の検出事例¹¹⁾

や、河川水からの抗菌薬の検出事例が報告されている¹²⁾。また、東南アジア、南アジア諸国への旅行者が多剤耐性菌を保菌して帰国する事例も報告されており、これらの発症事例については多剤耐性菌による環境の汚染が背景にあると考えられている⁸⁾。他にも、愛玩動物（ペット）、養殖業、農業などの分野でも抗菌薬は使用されており、これらの各分野における薬剤耐性菌の実態に関する報告もなされつつある^{13, 14)}。

このように、薬剤耐性菌の問題は幅広い領域における取り組みを通じて対策を進めていく必要がある課題であり、持続可能な人類の繁栄と地球環境の保全の両立に向けて、日進月歩で評価と対策についての研究が進んでいる。



図2 One Healthによる薬剤耐性菌の問題への取り組み⁶⁾

1.3 本研究の目的

本研究では、約 1,700 万人の水道水源であるとともに、多くの生物の生息地ともなっている淀川流域を対象に、人口が集中する都市部の河川（安威川・神崎川・淀川）や下水処理場及び医療機関を対象とした調査を行い、薬剤耐性菌の河川環境中における実態を先駆けて明らかにする。また、河川環境中での減衰効果が期待される太陽光による不活化効果に着目し、屋外及び室内における光照射実験を行うことで河川の流下過程における不活化の効果を評価するとともに、河川環境中における薬剤耐性菌の挙動の検証を試みる（図3）。そして、得られた結果に基づいて、薬剤耐性菌成分が有する環境へのインパクトについて考察を試み、より詳細で包括的な環境動態の解明に継げることで、これからの河川水質保全システムのあり方について情報提供を行い、当該事業の運用に資する。

本研究を遂行することにより、河川環境中に存在する薬剤耐性菌の存在実態と環境動態が初めて明らかになり、薬剤耐性菌が有する環境へのインパクトと、これからの河川水質保全システムのあり方について考察を行うことが可能になることが期待される。

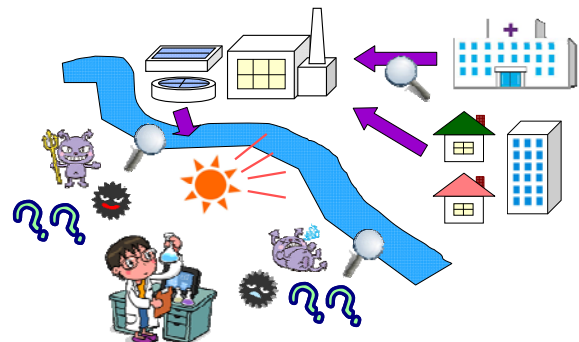


図3 薬剤耐性菌の実態の解明と太陽光による不活化効果の評価

2. 実験方法

2.1 研究対象とした薬剤耐性菌

研究対象とする薬剤耐性菌は、WHO が対策を求めている複数の抗菌薬に耐性を有する多剤薬剤耐性菌⁴⁾のうち、緊急度が高い又は動向に注意を要するとされている代表的な薬剤耐性菌である Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE)、Extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae*、Multi-drug-resistant *Acinetobacter* (MDRA)、Multi-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* (MDRP)、Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)、Vancomycin-resistant *Enterococci* (VRE)について調査を行った。

2.2 各種薬剤耐性菌の概要

2.2.1 カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: CRE)

カルバペネム系抗菌薬は極めて幅広い細菌に効果があり、ある程度の薬剤耐性を有する細菌にも効果を発揮するため、耐性菌治療の最終手段として使用⁸⁾されてきたが、この抗菌薬が効かない細菌である CRE(図 4)が 2000 年以降急速に世界に広がっており、リオデジャネイロオリンピックにおいて会場海域からも検出事例がなされている¹⁵⁾。アメリカにおける耐性率は約 10%¹⁶⁾であり、日本における耐性率は 1%程度⁵⁾であるが、今後の動向に注意を要するとされている。CRE による感染症の治療は困難であり、敗血症を引き起こすと最大で半数が死亡するため、2013 年に米国 CDC は全米に対し警告を発している¹⁷⁾。日本においては、CRE は感染症法で 5 類感染症の全数把握対象として定められている¹⁸⁾。コリスチンなど、極めて特殊な抗菌薬が必要となるが、現在はコリスチンに対しても耐性を有する腸内細菌も確認されつつある⁸⁾。



図 4 CRE の 3 次元イメージング (U. S. CDC)¹⁹⁾

2.2.2 基質拡張型ベータラクタマーゼ産生菌 (Extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae*: ESBL)

ESBL は細菌の名称ではなく、抗菌薬を分解して無効にする酵素の名称である。抗菌薬を分解する酵素の 1 つにベータラクタマーゼがあり、この酵素には多くの種類が存在するが、ほぼ全てのベータラクタム系抗菌薬を分解する酵素を産生する細菌を ESBL 産生菌 (図 5) と呼ぶ⁸⁾ (本研究では ESBL として表記)。

ESBL 産生菌は大腸菌など腸内の細菌に多く、尿路感染症などの原因となる。治療のために、広域な抗菌薬スペクトルを有するカルバペネム系抗菌薬が使用されることも多く、このことがさらなる ESBL 産生菌を生む背景になると指摘がなされている⁸⁾。



図 5 ESBL の 3 次元イメージング (U. S. CDC)¹⁹⁾

2.2.3 多剤耐性アシネトバクター (Multi-drug-resistant *Acinetobacter*: MDRA)

1990 年代の後半より、欧州で多剤耐性を獲得したアシネトバクター属菌による人工呼吸器関連肺炎が問題となり始めた。これらの起因菌として、アシネトバクター属菌の中でも *Acinetobacter baumannii* が多く、OXA-51 や OXA-23 等の OXA 型カルバペネマーゼを産生し多剤耐性を示す傾向が強く、欧州では当初 pan-European clone などと呼ばれていた²⁰⁾。

その後、*Acinetobacter baumannii* の中でも後に国際流行株 (International Clones I や II) と呼ばれるようになった特定の遺伝系統に属するアシネトバクターが多剤耐性を獲得し、VAP や院内感染を起こしやすいことが明らかになってきた。特に、International Clone II は、2018 年 1 月時点で最も広く世界中に拡散している遺伝型であり、パスツール研究所の遺伝型解析法 Multi-locus sequence Typing (MLST) で ST2 に分類されている。また、海外では MDRA の一部にコリスチン耐性を獲得した株が

出現している²⁰⁾。MDRA は感染症法で 5 類感染症（全数把握対象）として定められている¹⁸⁾。MDRA の分離頻度は、欧米で 34%、欧州では 48% と高い国もあるが、日本では 1% 以下と低く維持されている²¹⁾。

2.2.4 多剤耐性緑膿菌（Multi-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* : MDRP）

緑膿菌は病原性の弱い菌で、健康な人には感染を起こさない。しかし、病気や高齢などで免疫力が弱くなった場合に日和見感染し、肺炎や尿路感染症、菌血症などを引き起こす⁸⁾。

緑膿菌は劣悪な環境に耐えうる菌であり、多種類の抗菌薬に対して耐性を獲得している傾向が強い菌種であるが、1990 年代よりイミペネム等のカルバペネム系薬や、アミカシン等のアミノグリコシド系薬及びフルオロキノロン系薬に広範な耐性を獲得した株が出現し始めた。緑膿菌に効果のある薬剤には、カルバペネム系、フルオロキノロン系、アミノグリコシド系等の抗菌薬があるが、これら 3 剤全てに耐性を有する緑膿菌を MDRP（図 6）と呼ぶ。日本において、MDRP は感染症法で 5 類感染症（定点把握対象）として定められている¹⁸⁾。緑膿菌感染症には高い効果を示す抗菌薬が限られていることもあり、緑膿菌の薬剤耐性は治療上の大きな問題となる⁸⁾。



図 6 MDRP の 3 次元イメージング
(U. S. CDC)¹⁹⁾

2.2.5 メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* : MRSA）

1950 年代にペニシリンを分解する酵素を産生する、ペニシリナーゼ産生黄色ブドウ球菌が増加したため、1950 年代の後半にペニシリナーゼに分解されにくいメチシリンの販売が開始された。しかし、1961 年にはメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)（図 7）の発生が報告され、その後世界各地で MRSA が分離されるようになり今日に至っている²⁰⁾。

黄色ブドウ球菌は、鼻の中や皮膚に存在している細菌であるが、膿胸や感染性心内膜炎といった重症な感染症の原因ともなる。MRSA は多くの場合、メチシリンに加えて多種多様の抗菌薬に耐性を有しており、MRSA による感染症を起こした場合には、治療に特化した抗菌薬を使用しなくてはならない場合が多い⁸⁾。MRSA は劣悪な環境でも長期間生存する菌であり、多種類の抗菌薬に対して耐性を獲得している傾向が強い菌種である²²⁾。院内感染の原因菌として 1970 年代から病院等の医療機関で問題となっていたが、現在は市中にも広がりさらなる問題となっている。

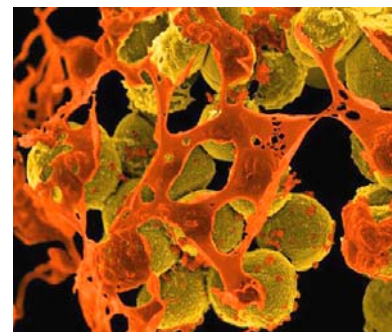


図 7 MRSA の 3 次元イメージング
(U. S. CDC)¹⁹⁾

MRSA は感染症法で 5 類感染症（定点把握対象）として定められており¹⁸⁾、日本における耐性率は 50% 程度である²³⁾。

2.2.6 バンコマイシン耐性腸球菌 (Vancomycin-resistant *Enterococci*: VRE)

バンコマイシンは、日本では 1981 年に経口薬、1991 年には MRSA 感染症の治療薬として注射薬が承認され、臨床現場での使用がなされている抗菌薬である²⁰⁾。バンコマイシンに耐性を有する腸球菌 (VRE) (図 8) は、1986 年頃に英国やフランスの病院で最初に相次いで分離され始め、その後急速に欧州や米国、さらに世界各地に広がった。日本では、1996 年に関西地域で初めて VRE 患者が報告されたのを契機に、その後各地の医療機関で散発的な分離や院内感染の事例が相次いで報告されている²⁰⁾。VRE の分離頻度は、欧米で 79%、韓国では 42% と高い国もあるが、日本では医療現場における早期検出と伝播防止策がなされており、1% 以下で維持されている²¹⁾。VRE は感染症法で 5 類感染症 (全数把握対象) として定められている¹⁸⁾。

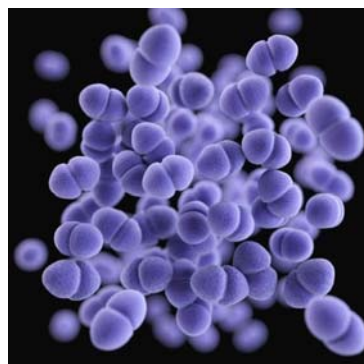


図 8 VRE の 3 次元イメージング (U. S. CDC)¹⁹⁾

2.3 サンプリング及び薬剤耐性菌の解析

2.3.1 対象流域の概要

本研究では、約 1,600 万人の水道水源であると同時に、1,000 種を超える動植物の生息地ともなっており、飲料水源と生態系保全の両面で日本を代表する重要な水系の 1 つである琵琶湖・淀川流域²⁴⁾に着目した (図 9)。そして、人口が集中する中下流域に位置する都市河川 (安威川・神崎川・淀川)²⁵⁾を対象とした調査を行った。

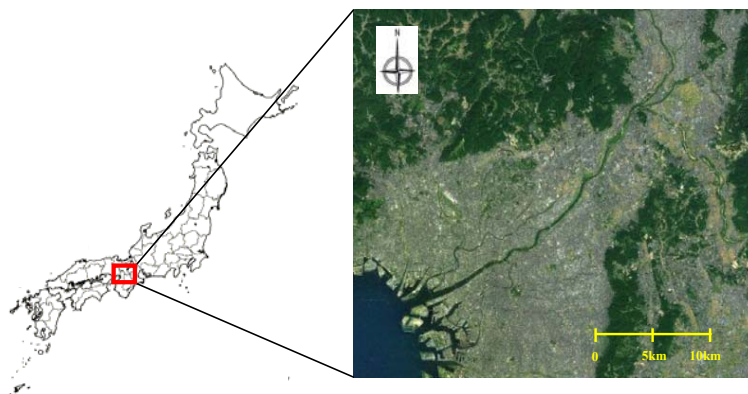


図 9 調査対象流域

2.3.2 サンプリングの方法

水試料の採取はステンレス製の採水バケツを用いて行い、採取した試料はオートクレーブで滅菌したガラスボトルに採取した。下水処理場の放流水試料については、試料の採取後にチオ硫酸ナトリウムを添加した。採取した水試料はクーラーボックスに入れて運搬し、採取後 12 時間以内に実験を行った。

2.3.3 薬剤耐性菌の検出方法

薬剤耐性菌の同定及び定量は、病院等の臨床現場において薬剤耐性菌の判別に用いられており^{26,27)}、排水や河川等の環境領域においても用いられている^{28,29)}、抗菌薬を含有する特定酵素基質培地法を基にした方法により行った。培養条件については、既

報^{28, 29)}を基に各々の寒天培地に検体を塗抹した後 37±1℃の好気条件で 24 時間培養し、培養後発色基質との反応により呈色したコロニー数を計測した。

2.4 屋外及び室内における光照射による薬剤耐性菌の不活化効果の評価

2.4.1 太陽光による不活化効果の評価試験

太陽光による薬剤耐性菌への不活化効果の評価は、EPA^{30, 31)}やOECD³²⁾によるガイドラインの他、微生物や化学物質を対象とした既報³³⁻³⁶⁾を基に行った。用いる水試料については、本研究に先立ち行った河川水及び下水処理場の放流水を対象とした基礎検討を基にして、河川水、下水処理場の二次処理水、下水処理場の流入水を混合した水試料を用いて評価を行った。

これらの水試料を、太陽光照射サンプルと、アルミホイルで遮光したコントロールに分けて、滅菌を行った石英試験管に各々移し、傾斜付きの試験管立てを用いて屋外に設置し、太陽光を照射させた(図10)。この時、時間経過に伴う揮発による体積量の変化に伴う濃度の変化を防ぐため、試験管はシリコン栓で栓をして実験を行った。

太陽光照射時間は朝 9 時から夕方 4 時までの 7 時間とし、照射開始を 0 時間として、経時的な不活化の影響を評価する目的で 0・1・2・3・5・7 時間後に試料を採取した。試料の採取時に、試験管内の溶液濃度が均一になる様に十分に転倒混合してから採取した。実験は、季節に依存した太陽光照射強度による不活化速度への影響について評価を試みる目的で、春・夏・秋・冬の季節毎に行った。紫外線照射強度の推移は 10 分毎に測定し、水温の他、日陰で気温もあわせて測定を行った。



図 10 太陽光による不活化評価実験

2.4.2 UVランプを用いた紫外線照射による不活化効果の評価試験

UVランプを用いた紫外線照射による薬剤耐性菌への不活化効果の評価は、EPA^{30, 31)}やOECD³²⁾によるガイドラインの他、微生物や化学物質を対象とした既報³⁷⁻⁴⁰⁾を基に行った。照射を行うUVの波長については、地表に到達する光線の波長領域を考慮して、波長302 nmを中心とした照射ピークを有するUVランプを用いて実験を行った。UVランプを用いた評価検討では、太陽光実験の際と同じ水試料を用いて評価を行い、水試料を滅菌した石英試験管に UV 照射サンプルと遮光サンプルに分けて各々移し、1 年の平均的な河川水温⁴¹⁾に該当する 20℃の恒温槽(暗所)で UV 照射を行った(図 11)。なお、太陽光による不活化実験の際と同様に、試験管はシリコン栓で栓をして実験を行った。

UV 照射開始時を 0 分として 0.5・1・2・5・10 分後に試料を採取した。試料の採取時には試験管内の溶液濃度が均一になる様に十分に転倒混合してから採取した。また、紫外線照射強度の測定についてもあわせて行った。



図 11 UV 照射による不活化評価実験

3. 結果と考察

3.1 都市部の河川流域における薬剤耐性菌の実態把握調査

本研究で対象とした河川水及び排水試料中から、対象とした薬剤耐性菌が分離された。各種水試料中に存在する薬剤耐性菌の濃度分布 (Colony forming unit (CFU) /mL) をまとめたものを図 12 に示す。得られた結果より、薬剤耐性菌が河川水から平均値で 1 CFU/mL~24 CFU/mL、下水処理場放流水から 1 CFU/mL~88 CFU/mL、流入水から 32 CFU/mL~2,120 CFU/mL、医療排水から 50 CFU/mL~1,577 CFU/mL の濃度で各々検出された。次に、各薬剤耐性菌に対応する微生物について、抗菌薬を含有しない培地を用いた測定により得られた結果を図 13 にまとめている。検出濃度は、河川水では平均値で 1 CFU/mL~116 CFU/mL、下水処理場放流水で 1 CFU/mL~353 CFU/mL、流入水で 97 CFU/mL~158,750 CFU/mL、医療排水では 574 CFU/mL~4,813 CFU/mL の濃度で分布していた。これらの結果を基にして、本研究で対象とした各種薬剤耐性菌について、各々の薬剤耐性の獲得割合について推計したところ、腸球菌については調査を行ったいずれの水試料においても数%程度であった。一方で、大腸菌や緑膿菌については 10%~40%程度であり、アシネトバクターや黄色ブドウ球菌については概ね 80~90%以上が抗菌薬に耐性を有している可能性があることが示唆された。

下水処理場における水処理の効果について、生物処理後に塩素消毒を行った後の放流水においては、薬剤耐性菌の検出濃度は流入水と比較して約 2~3 オーダー低く、水処理工程において大部分が消毒・不活化される傾向がみられた。これらの結果は、下水処理場における水処理工程で、大腸菌や大腸菌群に加えて薬剤耐性菌についても消毒効果が得られていると考えられた。

ところで、本研究では生物処理後に塩素消毒を行っている処理水に加え、生物処理後にオゾン処理を行っている処理水についてもあわせて対象としているが、オゾン処理を行っている水試料からは薬剤耐性菌は検出されないか、検出されても数 CFU/mL であった。このことは、高度処理としてのオゾン処理が、薬剤耐性菌に対する効果の高い不活化処理として有効であることを示唆していると考えられた。

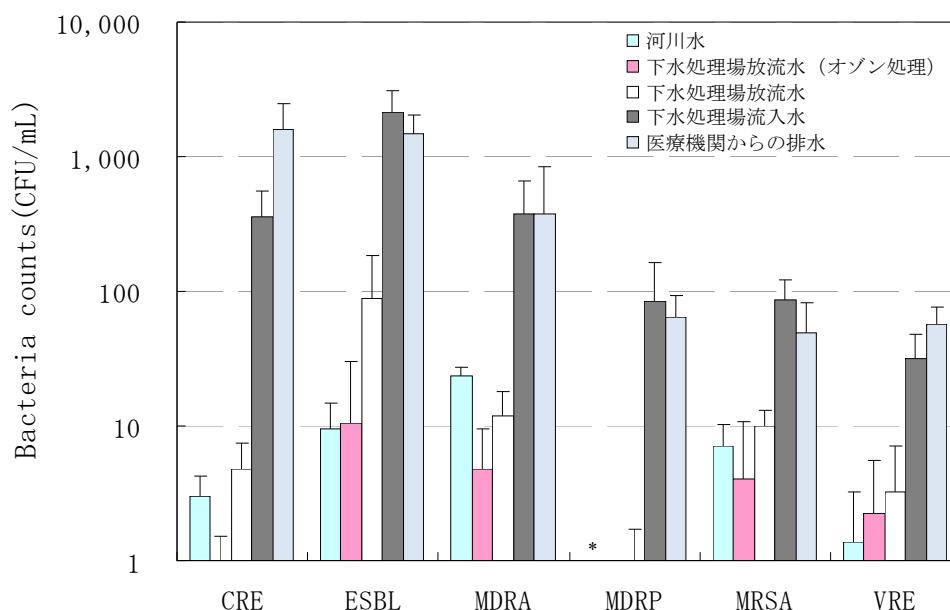


図 12 各種水試料中に存在する薬剤耐性菌の分布 (*:Not Detected)

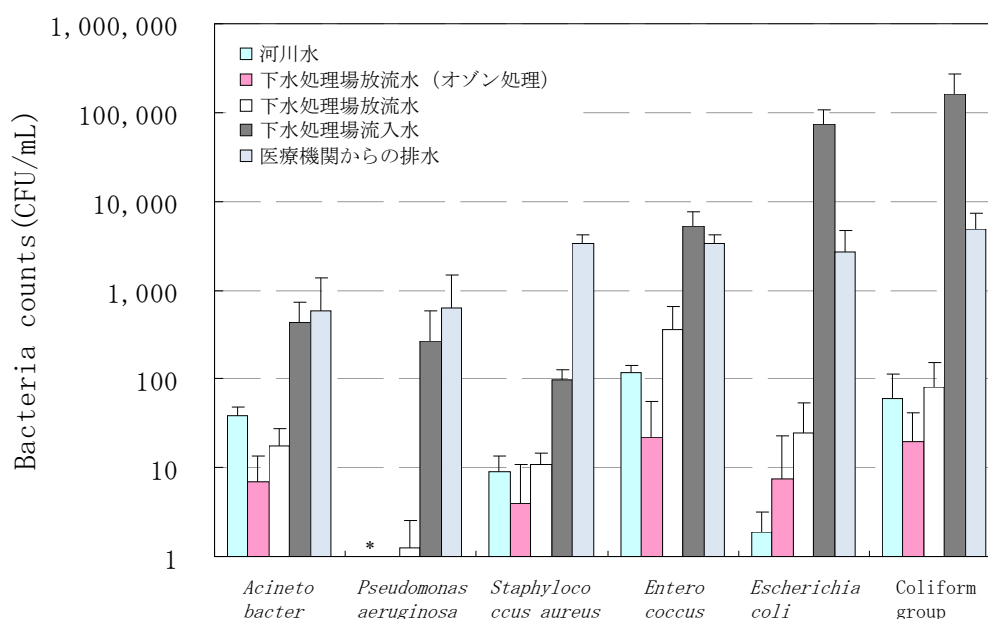


図 13 各種水試料中に存在する微生物の分布 (*:Not Detected)

これまでの研究により、大腸菌や大腸菌群の消毒^{42, 43)}や、病原性微生物の消毒⁴⁴⁾をはじめとして、ダイオキシン等の難分解性で残留性が高い有機汚染物質⁴⁵⁾ (Persistent Organic Pollutants : POPs) や、環境ホルモン等の内分泌かく乱化学物質⁴⁶⁾ (Endocrine Disrupting Chemicals : EDCs) や医薬品^{47, 48)} (Pharmaceutical and Personal Care Products : PPCPs) 等の生理活性を有する幅広い環境汚染物質の除去に、オゾン処理が有効であることが報告されている。本研究で得られた成果は、これらの報告にあわせて薬剤耐性菌の不活化に対してもオゾン処理が有効であることを示していると考えられる。今後調査を継続して行い、水環境中における薬剤耐性菌の環境動態の解明を行うとともに、詳細な環境リスクの評価と、そのリスク削減・低減に向けた対策についての知見の収集を図ることが重要であると考えられる。また、化学物質や大腸菌等の水質指標や病原性細菌／ウイルス等による環境汚染問題とあわせて流域における総合的な水質管理のあり方を模索していくことが重要であると考えられる。

3.2 太陽光による不活化効果の評価試験

本研究で評価を行った薬剤耐性菌 (CRE・ESBL・MDRA・MDRP・MRSA・VRE) の全てについて、太陽光照射に伴う不活化効果が確認された。太陽光による不活化効果は、各種薬剤耐性菌毎に若干異なる傾向がみられたが、太陽光照射から3～5時間後にはいずれの薬剤耐性菌についても不活化がほぼ完了する傾向がみられた。太陽光照射による各種薬剤耐性菌の経時的な不活化効果の推移を、図14 ((1)～(6)) に示す。

得られた結果より、MDRA及びMDRPについては、太陽光の照射に伴い速やかに不活化が進行する傾向がみられ、太陽光照射開始から2時間後に90%以上が不活化された。また、CRE・ESBL・VREについても太陽光による不活化効果は高く、2時間後に78%～88%が不活化していた。一方で、MRSAについては不活化率は1時間後で46%、2時間後で64%、3時間後で91%、5時間後で100%と、本研究で対象とした薬剤耐性菌の中では太陽光による不活化は緩やかに進行すると考えられた。これらの原因については、各種微生物を構成している細胞壁の構造等の差異⁴⁹⁾が関係している可能性が考えられた。

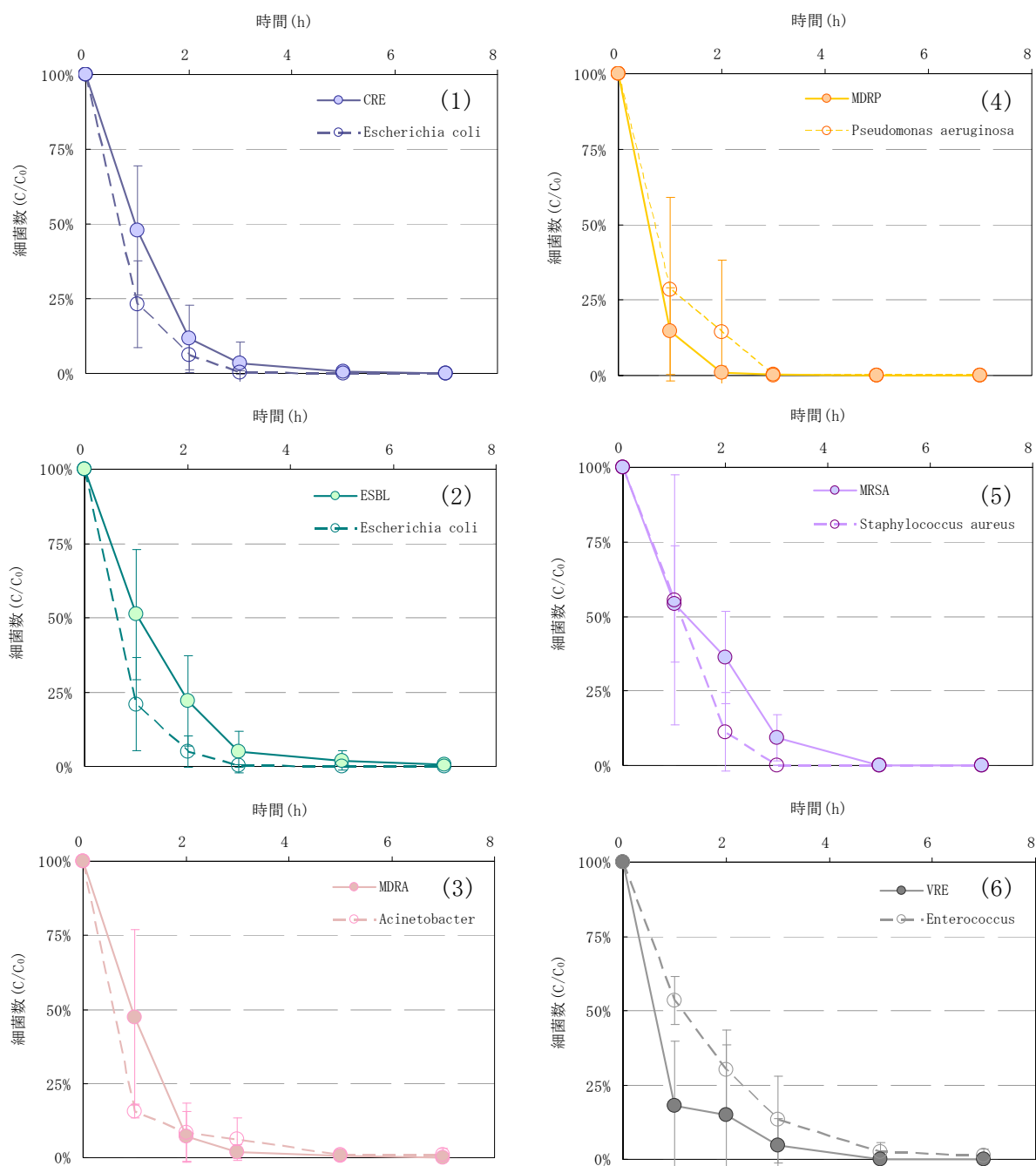


図 14 太陽光による薬剤耐性菌の経時的な不活化の推移 ((1):CRE, (2):ESBL, (3):MDRA, (4):MDRP, (5):MRSA, (6):VRE)

本評価実験は、春・夏・秋・冬の季節毎と日本において紫外線強度が最低～最高となる時期⁵⁰⁾に実施しているが、紫外線照射強度が最も低くなる冬季においても、太陽光照射から5時間後にはいずれの薬剤耐性菌についても不活化が完了する傾向がみられた。なお、本研究では薬剤耐性菌とあわせて、抗菌薬に感受性を有する各種微生物についても検討を行っているが、太陽光による不活化の効果は類似しており、薬剤感受性菌と薬剤耐性菌間で統計的に有意な差はみられなかった。これらの結果は、薬剤耐性菌に対する太陽光による不活化の効果について、薬剤耐性の獲得にあわせて環境中における種々の因子への適応性の可能性について評価を試みる上で、興味深い結果であると考えられる。

次に、太陽光による不活化効果をより詳細に評価するため、本実験で得られた結果を基にして経時的な不活化効果の推移について反応速度の解析を行ったところ、概ね1次反応に従って進行する傾向がみられた。また、太陽光により各種薬剤耐性菌の半数が不活化するのに要する時間は、CRE・ESBL・MDRA・MDRP・MRSA・VREについて、各々27 min～66 min、29 min～74 min、17 min～51 min、15 min～31 min、53 min～81 min、11 min～100 minと推定された。これまでの研究により、河川環境に流入する環境汚染物質について、病原性微生物^{51, 52)}や化学物質⁵³⁾の不活化や減衰に対して、太陽光が有効な不活化因子となることが報告されている。本研究で得られた結果は、これらの報告にあわせて薬剤耐性菌についても太陽光が水環境中における有効な不活化因子となることを示唆していると考えられた。

3.3 UV ランプを用いた紫外線照射による不活化効果の評価試験

水試料中に存在する薬剤耐性菌にUVランプによる紫外線照射を行った結果、対象とした全ての薬剤耐性菌について不活化効果が確認された。UV照射による各種薬剤耐性菌の経時的な不活化効果の推移を、図15（(1)～(6)）に示す。

得られた結果より、UV照射により薬剤耐性菌は速やかに不活化される傾向がみられた。UV照射開始から1分後における不活化率は、CRE・ESBL・MDRA・MDRP・MRSA・VREについて、各々100%、95%、91%、100%、92%、100%であった。これらの結果については、太陽光を照射した場合の不活化と類似していることから、太陽光のうち紫外線領域の波長の光が不活化に寄与していることを示唆していると考えられた。一方で、MRSAについては太陽光による不活化は穏やかに進行する傾向がみられるが、UV照射においては速やかに不活化が進行する傾向がみられた。このことについては、本研究で用いたUVランプの波長は、地表に到達するとされている光線の波長(>290～300 nm)^{54, 55)}のうち、照射強度は低いエネルギーが強く、細胞への影響が大きいと考えられる低波長域に着目した検討を行っていることに関係していると考えられた。なお、抗菌薬に感受性を有する各種微生物へのUV照射の効果については、太陽光による不活化の結果と同様に、薬剤感受性菌と薬剤耐性菌間で統計的に有意な差はみられず、3.2で述べたように薬剤耐性菌の特性に関係していると考えられた。

次に、太陽後照射の場合と同様に、経時的な不活化効果の推移について反応速度の解析を行ったところ、UV照射の場合においても概ね1次反応に従って進行する傾向がみられた。UVにより各種薬剤耐性菌の半数が不活化するのに要する時間は、CRE:0.2 min、ESBL:0.3 min、MDRA:0.3 min、MDRP:0.1 min、MRSA:0.3 min、VRE:0.3 minと推定された。これらの結果について、本研究で用いているUVランプと太陽光による紫外線照射強度を踏まえて比較すると、波長315 nm～400 nmのUV-A領域における紫外線強度は、太陽光に比べて本研究で用いたUVランプの方が約2～6倍程度高く、照射強度に応じて不活化効果が高くなる傾向がみられた。本研究で評価試験に用いているUVランプは、波長302 nmを中心とした照射ピークをもつUVランプであり、太陽光のように300 nm～400 nm付近の全ての領域の光の照射と完全には一致はしていないが、薬剤耐性菌の実河川環境中での挙動をラボスケールでの実験でも再現可能であることを明らかにしたことは、興味深い知見であると考えられる。

今後、実河川を対象とした太陽光による減衰効果をより詳細に評価するために、波長の異なる紫外線や、紫外線領域以外の波長領域の光による不活化の効果についても検討を試みていくことが重要であると考えられる。

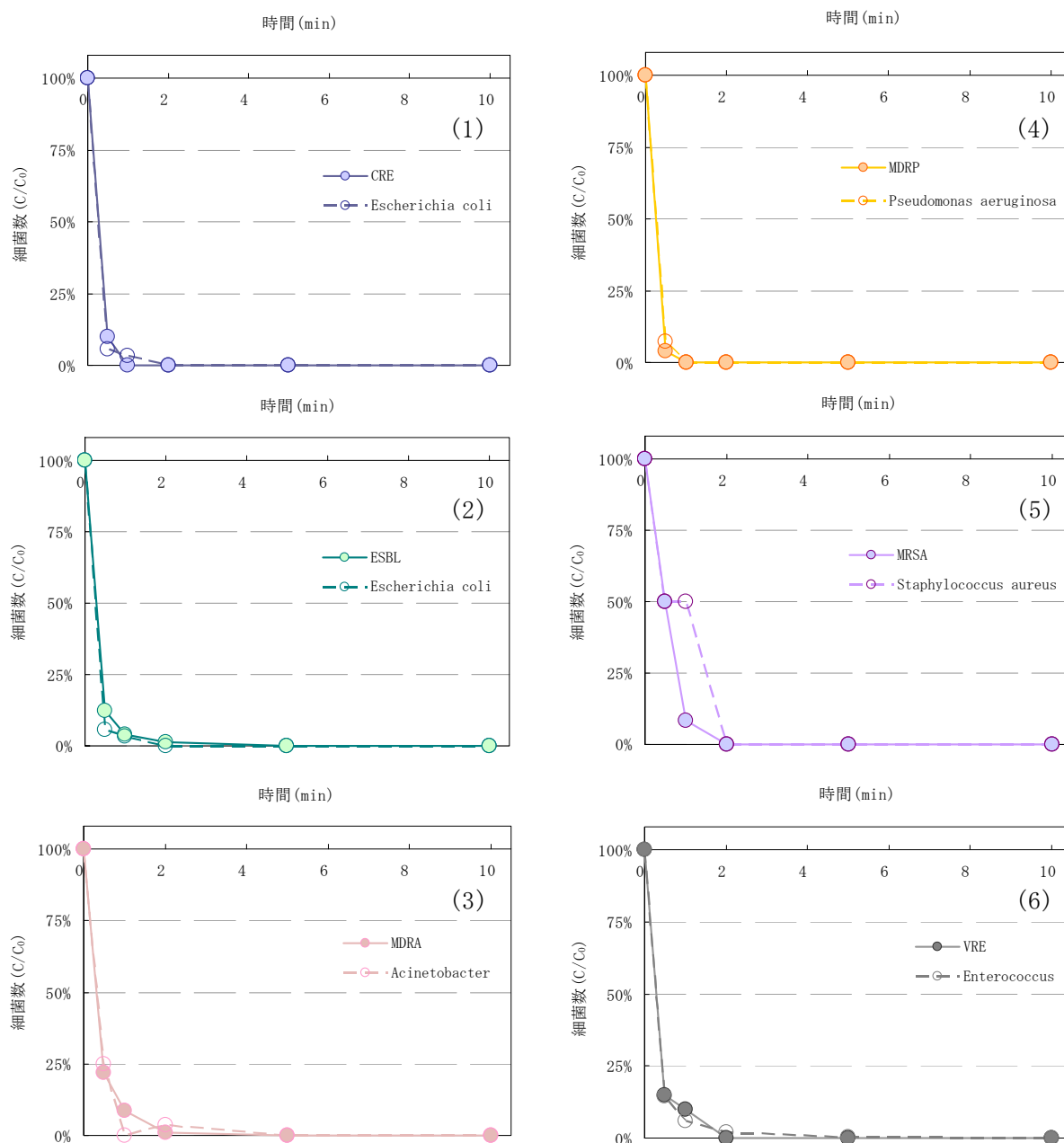


図 15 UV による薬剤耐性菌の経時的な不活化の推移 ((1):CRE, (2):ESBL, (3):MDRA, (4):MDRP, (5):MRSA, (6):VRE)

4. まとめと今後の課題

本研究では、淀川流域に位置する人口が集中する都市部の河川流域において、臨床領域で対策が求められている薬剤耐性菌について水環境中における存在実態の把握調査を行った。そして、屋外及び室内における光照射実験を行うことで河川の流下過程における不活化の効果を評価し、現地調査で得られた結果と比較検討することで、河川環境中における薬剤耐性菌の挙動の検証を試みた。

その結果、河川環境中に薬剤耐性菌が広く分布している傾向にあることを明らかにした。また、下水中に存在する薬剤耐性菌の大部分は水処理工程で除去される傾向にあるが、一部は河川へと流入する傾向がみられること、これらの薬剤耐性菌の不活化にオゾン処理が有効であることを明らかにした。

また、太陽光に着目した薬剤耐性菌の不活化の評価試験により、本研究で対象としたとした全ての薬剤耐性菌に対して、太陽光による不活化効果が期待出来ることを明らかにした。また、紫外線照射による各種薬剤耐性菌への不活化効果は微生物毎に異なり、CRE・ESBL・MDRA・MDRP・VREは速やかに不活化する傾向がみられるが、MRSAは不活化が穏やかに進行することを明らかにした。さらに、UVランプを用いたラボスケールでの評価試験により、薬剤耐性菌の不活化に波長 300 nm～400 nm 付近の紫外線領域の光が寄与していることを明らかにした。

今後現地での実態調査や不活化因子の評価実験を継続して行い、さらなる知見の収集を図るとともに、本研究で行った河川環境中の存在実態や挙動に関する知見を踏まえて環境リスク評価についても行っていくことが重要であると考えられる。また、河川環境の保全やヒトへの健康・安全性の確保を含めた河川管理システムや川づくりのあり方について考える上でも、化学物質や大腸菌等の水質指標、病原性細菌／ウイルス等による水環境汚染問題とあわせて、汚濁負荷の軽減を可能とする高度水処理技術の導入率の向上や、リスク削減に向けたこれからの流域水質管理のあり方を模索していくことが重要であると考えられる。

謝辞

本研究は、平成 31 年度 公益財団法人琵琶湖・淀川水質保全機構の「水質保全研究助成」による援助を受けて実施しました。また、本研究を遂行するにあたり、病院、河川及び下水処理場の関係者の方々から採水のご協力を頂きました。関係各位に厚く御礼を申し上げます。最後に、大阪薬科大学 環境分子生理学研究室の中山嵩大さん、山下恵里さん、山川恵里佳さん、吉川和真さんの各位に、調査、分析、データ整理等の協力を受けました。ここに記して厚く御礼申し上げます。

5. 参考文献

- 1) Harbarth, S., Balkhy, H.H., Goossens, H., Jarlier, V., Kluytmans, J., Laxminarayan, R., Saam, M., Van Belkum, A., Pittet, D. (2015) Antimicrobial resistance: one world, one fight! Antimicrobial Resistance and Infection Control, 4(1), 49.
- 2) Christou, A., Agüera, A., Bayona, J.M., Cytryn, E., Fotopoulos, V., Lambropoulou, D., Manaia, C.M., Michael, C., Revitt, M., Schröder, P., Fatta-Kassinos, D. (2017) The potential implications of reclaimed wastewater reuse for irrigation on the agricultural environment: The knowns and unknowns of the fate of antibiotics and antibiotic resistant bacteria and resistance genes - A review. Water Res., 123, 448-467.
- 3) Ben, Y., Fu, C., Hu, M., Liu, L., Wong, M.H., Zheng, C. (2019) Human health risk assessment of antibiotic resistance associated with antibiotic residues in the environment: A review. Environmental Research, 169, 483-493.
- 4) World Health Organization (WHO) (2015) Global action plan on antimicrobial resistance. 1-19.
- 5) 内閣官房国際感染症対策調整室 (2016) 薬剤耐性 (AMR) 対策アクションプラン. 1-71.
- 6) Melbourne Health National Centre for Antimicrobial Stewardship (NCAS),

- (2020) One Health, Available from <<https://www.ncas-australia.org/one-health>>.
- 7) Inge van, L., Xander, H., Edine, T., Albert, J.d.N., Nienke van de, S.-B., Desiree, B., Andreas, V., Jan, K. (2007) Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of animal origin in humans. *Emerging Infectious Disease Journal*, 13(12), 1834.
 - 8) 国立研究開発法人 国立国際医療研究センター AMR 臨床リファレンスセンター, 厚生労働省委託事業 かしくく治して、明日につなぐ～抗菌薬を上手に使う薬剤耐性 (AMR) 対策～, Available from <<http://amr.ncgm.go.jp/>>.
 - 9) Gothwal, R., Shashidhar, T. (2015) Antibiotic pollution in the environment: A review. *CLEAN - Soil, Air, Water*, 43(4), 479-489.
 - 10) Singer, A.C., Shaw, H., Rhodes, V., Hart, A. (2016) Review of antimicrobial resistance in the environment and its relevance to environmental regulators. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1728 (1721-1722).
 - 11) Urase, T., Sato, T. (2016) Quantitative monitoring of resistance in *Escherichia coli* to clinically important antimicrobials in an urban watershed. *Journal of Water and Environment Technology*, 14(5), 341-349.
 - 12) Azuma, T., Arima, N., Tsukada, A., Hirami, S., Matsuoka, R., Moriwake, R., Ishiuchi, H., Inoyama, T., Teranishi, Y., Yamaoka, M., Mino, Y., Hayashi, T., Fujita, Y., Masada, M. (2016) Detection of pharmaceuticals and phytochemicals together with their metabolites in hospital effluents in Japan, and their contribution to sewage treatment plant influents. *Sci. Total Environ.*, 548-549, 189-197.
 - 13) 浅井 鉄夫 (2017) 薬剤耐性 (AMR) 対策アクションプランで注目される耐性菌 動物. *臨床と微生物*, 44(4), 303-308.
 - 14) van Bruggen, A.H.C., Goss, E.M., Havelaar, A., van Diepeningen, A.D., Finckh, M.R., Morris, J.G. (2019) One Health – Cycling of diverse microbial communities as a connecting force for soil, plant, animal, human and ecosystem health. *Sci. Total Environ.*, 664, 927-937.
 - 15) Paschoal, R.P., Campana, E.H., Corrêa, L.L., Montezzi, L.F., Barrueto, L.R.L., da Silva, I.R., Bonelli, R.R., Castro, L.d.S., Picão, R.C. (2017) Concentration and variety of carbapenemase producers in recreational coastal waters showing distinct levels of pollution. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(12), e01963-01917.
 - 16) World Health Organization (WHO) (2014) Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014. 1-232.
 - 17) 荒川 宜親 (2015) カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*, CRE) 等新型多剤耐性菌のグローバル化と臨床的留意点. *日本化学療法学会雑誌*, 63(2), 187-197.
 - 18) 国立感染症研究所, 感染症発生動向調査～届出について～ 対象疾患一覧 (感染症法における感染症の分類), Available from <<https://www.niid.go.jp/niid/ja/>>.
 - 19) Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Available from <<http://www.cdc.gov/>>.

- 20) 中込 治 (2018) 標準微生物学 第 13 版 医学書院.
- 21) 厚生労働省, (2015) 第 12 回院内感染対策中央会議, Available from <<https://www.mhlw.go.jp/stf/shingi2/0000072946.html>>.
- 22) Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2019) Guidelines for Environmental Infection Control in Health-Care Facilities Recommendations of CDC and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). 1-241.
- 23) MRSA 感染症の治療ガイドライン作成委員会 (2017) MRSA 感染症の治療ガイドライン 2017 年改訂版 1-136.
- 24) 公益財団法人 琵琶湖・淀川水質保全機構 (2019) BYQ 水環境レポートー琵琶湖・淀川の水環境の現状ー平成 29 年度, 1-93.
- 25) 大阪府 (2015) 淀川水系神崎川下流ブロック河川整備計画. 1-30.
- 26) Perry, J.D., Freydière, A.M. (2007) The application of chromogenic media in clinical microbiology. *Journal of Applied Microbiology*, 103(6), 2046-2055.
- 27) Perry, J.D. (2017) A decade of development of chromogenic culture media for clinical microbiology in an era of molecular diagnostics. *Clinical Microbiology Reviews*, 30(2), 449-480.
- 28) Lamba, M., Graham, D.W., Ahammad, S.Z. (2017) Hospital wastewater releases of carbapenem-resistance pathogens and genes in urban India. *Environ. Sci. Technol.*, 51(23), 13906-13912.
- 29) Haller, L., Chen, H., Ng, C., Le, T.H., Koh, T.H., Barkham, T., Sobsey, M., Gin, K.Y.-H. (2018) Occurrence and characteristics of extended-spectrum β -lactamase- and carbapenemase- producing bacteria from hospital effluents in Singapore. *Sci. Total Environ.*, 615, 1119-1125.
- 30) U.S. Environmental Protection Agency (EPA) (1998) Fate, transport and transformation: Test guidelines OPPTS 835.2210. Direct photolysis rate in water by sunlight. 1-35.
- 31) U.S. Environmental Protection Agency (EPA) (1998) Fate, transport and transformation: Test guidelines OPPTS 835.2240. Photodegradation in water. 1-4.
- 32) OECD (2008) Phototransformation of chemicals in water-direct photolysis, OECD guideline for the testing of chemicals No.316., 1-53.
- 33) Boyle, M., Sichel, C., Fernández-Ibáñez, P., Arias-Quiroz, G.B., Iriarte-Puñá, M., Mercado, A., Ubomba-Jaswa, E., McGuigan, K.G. (2008) Bactericidal effect of solar water disinfection under real sunlight conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74(10), 2997.
- 34) Fisher, M.B., Iriarte, M., Nelson, K.L. (2012) Solar water disinfection (SODIS) of *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp., and MS2 coliphage: Effects of additives and alternative container materials. *Water Res.*, 46(6), 1745-1754.
- 35) Yamamoto, H., Nakamura, Y., Moriguchi, S., Nakamura, Y., Honda, Y., Tamura, I., Hirata, Y., Hayashi, A., Sekizawa, J. (2009) Persistence and partitioning of eight selected pharmaceuticals in the aquatic environment: Laboratory

- photolysis, biodegradation, and sorption experiments. *Water Res.*, 43(2), 351-362.
- 36) Hanamoto, S., Nakada, N., Yamashita, N., Tanaka, H. (2013) Modeling the photochemical attenuation of down-the-drain chemicals during river transport by stochastic methods and field measurements of pharmaceuticals and personal care products. *Environ. Sci. Technol.*, 47(23), 13571-13577.
 - 37) Hassen, A., Mahrouk, M., Ouzari, H., Cherif, M., Boudabous, A., Damelinourt, J. J. (2000) UV disinfection of treated wastewater in a large-scale pilot plant and inactivation of selected bacteria in a laboratory UV device. *Bioresource Technology*, 74(2), 141-150.
 - 38) Lutterbeck, C.A., Wilde, M.L., Baginska, E., Leder, C., Machado, Ê.L., Kümmerer, K. (2016) Degradation of cyclophosphamide and 5-fluorouracil by UV and simulated sunlight treatments: Assessment of the enhancement of the biodegradability and toxicity. *Environmental Pollution*, 208, Part B, 467-476.
 - 39) Blum, K.M., Norström, S.H., Golovko, O., Grabic, R., Järhult, J.D., Koba, O., Söderström Lindström, H. (2017) Removal of 30 active pharmaceutical ingredients in surface water under long-term artificial UV irradiation. *Chemosphere*, 176, 175-182.
 - 40) He, H., Zhou, P., Shimabuku, K.K., Fang, X., Li, S., Lee, Y., Dodd, M.C. (2019) Degradation and deactivation of bacterial antibiotic resistance genes during exposure to free chlorine, monochloramine, chlorine dioxide, ozone, ultraviolet light, and hydroxyl radical. *Environ. Sci. Technol.*, 53(4), 2013-2026.
 - 41) 国土交通省 近畿地方整備局 淀川河川事務所, 公共用水域の水質データ, Available from <http://www.yodogawa.kkr.mlit.go.jp/know/data/water/index.html>.
 - 42) Hunt, N.K., Mariñas, B.J. (1999) Inactivation of *Escherichia coli* with ozone: chemical and inactivation kinetics. *Water Res.*, 33(11), 2633-2641.
 - 43) Sharrer, M.J., Summerfelt, S.T. (2007) Ozonation followed by ultraviolet irradiation provides effective bacteria inactivation in a freshwater recirculating system. *Aquacultural Engineering*, 37(2), 180-191.
 - 44) Loeb, B.L. (2011) Ozone: Science & Engineering: Thirty-three years and growing. *Ozone: Science & Engineering*, 33(4), 329-342.
 - 45) Barceló, D., Petrovic, M. (2008) Emerging contaminants from industrial and municipal waste. Springer.
 - 46) Gmurek, M., Olak-Kucharczyk, M., Ledakowicz, S. (2017) Photochemical decomposition of endocrine disrupting compounds - A review. *Chemical Engineering Journal*, 310, Part 2, 437-456.
 - 47) Rivera-Utrilla, J., Sánchez-Polo, M., Ferro-García, M.Á., Prados-Joya, G., Ocampo-Pérez, R. (2013) Pharmaceuticals as emerging contaminants and their removal from water. A review. *Chemosphere*, 93(7), 1268-1287.
 - 48) Kanakaraju, D., Glass, B.D., Oelgemöller, M. (2018) Advanced oxidation process-mediated removal of pharmaceuticals from water: A review. *Journal of*

- Environmental Management, 219, 189-207.
- 49) Garcia, A.B., Vinuela-Prieto, J.M., Lopez-Gonzalez, L., Candel, F.J. (2017) Correlation between resistance mechanisms in *Staphylococcus aureus* and cell wall and septum thickening. *Infect Drug Resist*, 10, 353-356.
- 50) 国立環境研究所 (2006) 絵とデータで読む太陽紫外線－太陽と賢く仲良くつきあう法－. 1-112.
- 51) Schultz-Fademrecht, C., Wichern, M., Horn, H. (2008) The impact of sunlight on inactivation of indicator microorganisms both in river water and benthic biofilms. *Water Res.*, 42(19), 4771-4779.
- 52) Nelson, K.L., Boehm, A.B., Davies-Colley, R.J., Dodd, M.C., Kohn, T., Linden, K.G., Liu, Y., Maraccini, P.A., McNeill, K., Mitch, W.A., Nguyen, T.H., Parker, K.M., Rodriguez, R.A., Sassoubre, L.M., Silverman, A.I., Wigginton, K.R., Zepp, R.G. (2018) Sunlight-mediated inactivation of health-relevant microorganisms in water: a review of mechanisms and modeling approaches. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 20(8), 1089-1122.
- 53) Baena-Nogueras, R.M., González-Mazo, E., Lara-Martín, P.A. (2017) Photolysis of antibiotics under simulated sunlight irradiation: Identification of photoproducts by high-resolution mass spectrometry. *Environ. Sci. Technol.*, 51(6), 3148-3156.
- 54) Zepp, R.G., Cline, D.M. (1977) Rates of direct photolysis in aquatic environment. *Environ. Sci. Technol.*, 11(4), 359-366.
- 55) Dulin, D., Mill, T. (1982) Development and evaluation of sunlight actinometers. *Environ. Sci. Technol.*, 16(11), 815-820.